EXPRESS MAIL NO. EV335396877USUS

世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 **C12N 15/01, 15/11, 1/21**	**A1**	(11) 国際公開番号 **WO00/28015** (43) 国際公開日 2000年5月18日(18.05.00)

(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06294

(22) 国際出願日 1999年11月11日(11.11.99)

(30) 優先権データ
特願平10/321143 1998年11月11日(11.11.98) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
科学技術振興事業団
(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)
[JP/JP]
〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP)

(72) 発明者；および

(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
田辺清司(TANABE, Kiyoshi)[JP/JP]
〒939-0364 富山県射水郡小杉町太閤山2-1-3-307
Toyama, (JP)
古澤　満(FURUSAWA, Mitsuru)[JP/JP]
〒134-0088 東京都江戸川区西葛西6-6-8
パークファミリア605 Tokyo, (JP)

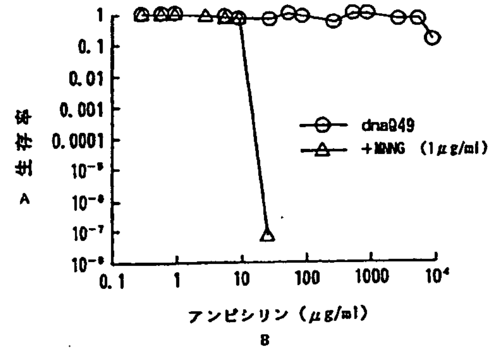
(74) 代理人
弁理士　西澤利夫(NISHIZAWA, Toshio)
〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階
Tokyo, (JP)

(81) 指定国　JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)

添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: **MUTAGENESIS METHOD**

(54)発明の名称　突然変異誘発方法



A... SURVIVING FRACTION
B... AMPICILLIN

(57) Abstract

A method for introducing mutations into a gene characterized in that a larger number of point mutations are introduced into one strand of a double-stranded genomic DNA of a cell or an organism individual than into the other strand. Use of this method makes it possible to efficiently and effectively construct various useful mutants of microorganisms, cells or organism individuals. By analyzing the mutation conditions of the gene, moreover, it becomes possible to clarify the mechanism of drug tolerance, to estimate the occurrence of a novel insensible bacterium or to develop a drug therefor, to analyze the mutation of an oncogene and the mechanisms of cancer metastasis and increase in malignancy, and to develop methods for using these mechanisms.

BEST AVAILABLE COPY

(57)要約

この出願は、細胞または生物個体の二重鎖ゲノム DNA の一方の鎖に他方よりも多く点突然変異を導入することを特徴とする遺伝子への突然変異導入法を提供する。この方法によって、微生物や細胞、または生物個体の多様かつ有用な変異体を効率的、効果的に作製することが可能となる。また、遺伝子の変異の状況を解析することにより、薬剤耐性のメカニズムの解明、新規な耐性菌の発生予測はその対応薬剤の開発への利用や、ガン遺伝子の変異と転移や悪性度の増加のメカニズムの解析とその利用法の開発等が可能となる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦
AL	アルバニア
AM	アルメニア
AT	オーストリア
AU	オーストラリア
AZ	アゼルバイジャン
BA	ボズニア・ヘルツェゴビナ
BB	バルバドス
BE	ベルギー
BF	ブルギナ・ファソ
BG	ブルガリア
BJ	ベナン
BR	ブラジル
BY	ベラルーシ
CA	カナダ
CF	中央アフリカ
CG	コンゴー
CH	スイス
CI	コートジボアール
CM	カメルーン
CN	中国
CR	コスタ・リカ
CU	キューバ
CY	キプロス
CZ	チェッコ
DE	ドイツ
DK	デンマーク
DM	ドミニカ
EE	エストニア
ES	スペイン
FI	フィンランド
FR	フランス
GA	ガボン
GB	英国
GD	グレナダ
GE	グルジア
GH	ガーナ
GM	ガンビア
GN	ギニア
GW	ギニア・ビサオ
GR	ギリシャ
HR	クロアチア
HU	ハンガリー
ID	インドネシア
IE	アイルランド
IL	イスラエル
IN	インド
IS	アイスランド
IT	イタリア
JP	日本
KE	ケニア
KG	キルギスタン
KP	北朝鮮
KR	韓国
KZ	カザフスタン
LC	セントルシア
LI	リヒテンシュタイン
LK	スリ・ランカ
LR	リベリア
LS	レソト
LT	リトアニア
LU	ルクセンブルグ
LV	ラトヴィア
MA	モロッコ
MC	モナコ
MD	モルドヴァ
MG	マダガスカル
MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML	マリ
MN	モンゴル
MR	モーリタニア
MW	マラウイ
MX	メキシコ
NE	ニジェール
NL	オランダ
NO	ノールウェー
NZ	ニュー・ジーランド
PL	ポーランド
PT	ポルトガル
RO	ルーマニア
RU	ロシア
SD	スーダン
SE	スウェーデン
SG	シンガポール
SI	スロヴェニア
SK	スロヴァキア
SL	シエラ・レオネ
SN	セネガル
SZ	スワジランド
TD	チャード
TG	トーゴー
TJ	タジキスタン
TZ	タンザニア
TM	トルクメニスタン
TR	トルコ
TT	トリニダッド・トバゴ
UA	ウクライナ
UG	ウガンダ
US	米国
UZ	ウズベキスタン
VN	ヴィェトナム
YU	ユーゴースラビア
ZA	南アフリカ共和国
ZW	ジンバブエ

明細書

突然変異誘発方法

技術分野

この出願の発明は、細胞または生物個体に効率良く突然変異を導入でき、かつ、処理細胞や処理個体群の絶滅の危険性を低減できる、有効かつ効果の高いランダム突然変異導入方法と、この方法によって得られる変異体および変異表現型遺伝子に関するものである。

背景技術

細胞や生物個体を遺伝的に改変する技術には、細胞や生物個体に紫外線、放射線、変異原物質等の変異原を作用させて遺伝子にランダム突然変異を誘発させる方法、細胞や生物個体に外来の遺伝子を導入して遺伝子工学的に改変する方法等がある。また、特定の遺伝子に突然変異を誘発させる場合には PCR 増幅技術を利用して DNA に複製ミスを蓄積させるインビトロ突然変異誘発や部位特異的突然変異誘発などの遺伝子工学的手法を利用する方法も知られている。

一般に、改変したい遺伝子や変異を導入する部位などが明らかとなっている場合は遺伝子工学的手法が有効な場合があるが、改変したい表現型やその遺伝子についての知識が不十分な場合においては、遺伝子にランダムに突然変異を導入し、得られる変異体から目的とする変異表現型を有する細胞や生物個体を選択するランダム突然変異誘発を利用する方法が有効である。このランダム突然変異誘発には細胞や生物個体に紫外線やX線、あるいは、放射線を照射して突然変異を誘発させる方法、ナイトロジェン・マスタードやニトロソグアニジンなどの変異原物質を作用させて突然変異を誘発させる方法がある。

従来のランダム突然変異の導入技術においては、紫外線や変異原などにより誘発される突然変異率が処理の効率や効果に重要な影響を及ぼしている。すなわち、誘発される突然変異率が至適な範囲内においては DNA に有効な量の突然変異が蓄積さ

れるが、至適量より少なければ導入された突然変異が DNA の修復機構等により修復されることがあり、効率よく突然変異を導入できない。また、至適量を超えた場合は、導入される突然変異による生物体への致死効果が強くなり、目的の変異体を得る前に突然変異導入処理群が絶滅し、目的とする変異体が得られない結果となる。

また、至適量は一回の処理あたりの量のみならず、より有用性の高い変異体を得るために変異導入処理と変異体の選択を複数回交互に継続して行う場合も同様で、注意深く至適量を決定しなければ効率が悪いか、または変異導入処理群の絶滅によって、結果的に有用性の高い変異体を得ることができない。さらに、ランダム突然変異導入によって改変したい細胞や生物個体の表現型が単一の遺伝子に複数の突然変異を導入する必要がある場合や、複数の遺伝子に突然変異を導入する必要がある場合などは、これらの遺伝子に好ましい変異が蓄積されるまでランダム突然変異を挿入する必要があるが、多数の突然変異の蓄積は生存に必要な遺伝子にも致死的な変異が導入される危険が高くなり、突然変異率を高くすればするほど処理した細胞や生物個体の絶滅の危険性が高まり、効率的に有用な突然変異体を得ることが期待できなくなる。

また、最近、細胞や生物個体を遺伝的に改変する目的ではないが、それぞれ、DNA 塩基対のミスペアの校正機能、A/T－G/C トランスバージョン、DNA のミスマッチ修復等に係わるミューテーター遺伝子である mutD、mutS、mutT を同時に持つ大腸菌変異株の突然変異率が野生株の５千倍であることを利用し、この菌株内でプラスミドに挿入した遺伝子に効率よくランダム突然変異を導入する方法も開発されている（Molecular Biotechnology 7:189-195, 1997）。この方法によると 24 世代、約１日の培養でプラスミド上の遺伝子に 1,000 塩基対当たり１個の突然変異を導入できる。しかしながら、このような高い突然変異率は変異を導入したい遺伝子の変異誘発の確率を増加させるが、同時に生存に必要な遺伝子など他の遺伝子にも変異を導入する危険性を高める。このため、突然変異を導入したい DNA 領域の長さが 100 塩基対以下である場合や何カ所にも突然変異を入れたい場合は、増殖世代数が増大し実際的でないという理由で PCR 法が推奨されている。また、突然変異率が高いために本菌株の長期的な培養は菌自体やその遺伝子型が影響を受けるので注意が必要である

ことも指摘されている。従って、この方法は宿主に導入したプラスミド上の遺伝子に突然変異を導入するには適していても、宿主自体を遺伝的に改変することには適していない。

以上のとおり、従来の細胞や生物個体へのランダム突然変異導入方法においては、多くの突然変異導入と変異導入処理群の絶滅回避とは二律背反の要件であって、多様かつ有用な変異体を高率よく得ることは困難であった。

この出願の発明は、以上の事情に鑑みてなされたものであって、細胞や生物個体に高い突然変異率でランダム突然変異を導入しつつ、同時に処理群の絶滅の危険性を低減し、効率よく有用かつ多様な突然変異体を得る方法を提供することを課題としている。

発明の開示

この出願は、前記の課題を解決する発明として、細胞または生物個体の二重鎖ゲノム DNA の一方の鎖に他方よりも多く点突然変異を導入することを特徴とする遺伝子への突然変異導入方法を提供する。

この発明の突然変異導入方法における第１の好ましい態様は、二重鎖ゲノム DNA を構成する４種の塩基に対してランダムに点突然変異を導入する突然変異導入方法である。

第２の好ましい態様は、細胞または生物個体が、突然変異修復機構遺伝子群にミューテーター遺伝子を有する変異細胞株または変異生物個体である突然変異導入方法である。なお、この変異細胞株または変異生物個体は、ミューテーター遺伝子を本来的に有するものでもよく、あるいは外来性のミューテーター遺伝子を導入されたものでもよい。

第３の好ましい態様は、上記方法において、ミューテーター遺伝子が、dnaQ、dnaE、mutL、mutS、mutH、uvrD、dam からなる群より選択される１種または２種以上のミューテーター遺伝子である突然変異導入方法である。

第４の好ましい態様は、上記方法において、ミューテーター遺伝子が、所定の条件下で突然変異修復機構の欠損を生じさせる遺伝子である突然変異導入方法である。

第５の好ましい態様は、上記方法において、突然変異修復機構の欠損条件が所定の温度である突然変異導入方法である。

第６の好ましい態様は、上記方法において、所定の条件下でゲノム DNA へ突然変異を導入する工程と、突然変異を導入しない選択圧条件で変異体を選択する工程を繰り返すことを特徴とする突然変異導入方法である。

第７の好ましい態様は、前記態様において、第２回目以降の突然変異導入工程を、直前の変異体選択工程と同一の選択圧下で行う突然変異導入方法である。

この出願はまた、別の発明として、上記の突然変異導入方法のいずれかによってゲノム DNA に突然変異が導入された細胞または生物個体の突然変異体、およびこの突然変異体より単離された変異遺伝子を提供する。

図面の簡単な説明

第１図は、変異導入前の dnaQ49 株および野生株のアンピシリン濃度－生残曲線である。

第２図は、第１回目の変異導入後の dnaQ49 株、野生型および MNNG 野生型のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度－生残曲線である。

第３図は、第２回目の変異導入後の dnaQ49 株、野生型および MNNG 野生型のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度－生残曲線である。

第４図は、第３回目の変異導入後の dnaQ49 株、野生型および MNNG 野生型のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度－生残曲線である。

第６図は、第４回目の変異導入後の dnaQ49 株、野生型および MNNG 野生型のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度－生残曲線である。

第６図は、第５回目の変異導入後の dnaQ49 株、野生型および MNNG 野生型のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度－生残曲線である。

第７図は、別の dnaQ49 株における第５回目の変異導入後のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度－生残曲線である。

第８図は、野生型 $dnaQ^+$ 株および dnaQ49 株のそれぞれの ampC 遺伝子由来の DNA 断片のアガロース電気泳動図である。

発明を実施するための最良の形態

自然突然変異は次の様な経緯で固定される。まず、染色体 DNA に物理的、化学的に影響を与える生体内代謝産物や酸素ラジカルなどにより損傷が発生したり、DNA 複製のエラーなどにより誤った塩基対が生じる。このような染色体 DNA に生じる損傷や複製エラーは前変異損傷と呼ばれ、この前変異損傷が次回の DNA 複製の際に修復されないと染色体 DNA に突然変異として固定される。自然突然変異における前変異損傷発生の原因の殆どは複製エラーであり、物理的、化学的な影響による染色体 DNA の損傷の割合は少ない（CRC, 1(3):140-148, 1992）。複製エラーは DNA 合成の際に４種の塩基の互変異性に基づく誤った塩基対の形成によって起こり、その頻度は１０-4から１０-5である(Molecular Biology of the Cell, Garland Publish Inc. New York & London 224-225, 1983）。一方、細胞には種々の突然変異修復機能があり、DNA 合成酵素の持つ校正機能やミスマッチ修復系などによってそれぞれ 10^{-3} 程度ずつ前変異損傷は修復され、最終的に塩基置換による点突然変異が固定される頻度は１塩基あたり 10^{-10} から 10^{-11} まで低下する（CRC, 1(3):140-148, 1992）。この他にも、塩基の挿入、欠失によるフレームシフト突然変異があるが、その頻度は非常に小さい。

従来のランダム突然変異誘発処理は、放射線、紫外線などのエネルギー線照射や変異原物質処理による物理的、化学的な影響を強めて染色体 DNA に前変異損傷を増加させ、その変異が固定化される確率を高めるものである。変異原の種類と誘発される前変異損傷にはそれぞれ特徴があり、例えば、紫外線では点突然変異と欠失突然変異が同程度誘発されるが点突然変異では G/C－A/T 方向のトランジション変異がよく起こるとされている。また、Ｘ線では DNA 鎖の二本鎖の一方のみが切断される１本鎖切断と両方が切断される２本鎖切断があり、その結果、点突然変異や欠失突然変異が引き起こされるが欠失突然変異が点突然変異よりも 10 倍起こりやすい（分子放射線生物学、近藤宗平著、東京大学出版会、138-139 、1972 年）。

一方、複製エラーや突然変異の修復に関係し、突然変異を増加させるミューテーター遺伝子には様々なものが知られており、その機能別に５つに分類することがで

きる（CRC, 1(3):140-148, 1992）。第１は、DNA 複製エラーの制御系に係わる DNA 合成酵素のαサブユニットの変異である。現在までに知られているのは dnaE 遺伝子であり、このミューテーター遺伝子は突然変異を千倍から 10 万倍増加させる。第２は、ミスペアを即座に取り除く校正機能に関与する DNA 合成酵素のεサブユニットの変異である。このミューテーター遺伝子としては dnaQ（mutD）が知られており、これも千倍から 10 万倍突然変異を増加させる。第３は、校正機能が修正し損なったミスペアを除去修復するミスマッチ修復に係わるもので、mutL、mutS、mutH、uvrD、dam、mutY、mutM、ung が知られており、それぞれ 10 倍から千倍突然変異を増加させる。第４は、DNA 原料となるヌクレオチドプールの浄化機能に関するもので、A/T－G/C トランスバージョンのみを増加させる mutT が知られている。このミューテーター遺伝子を持つ細胞は増殖に伴って DNA 中の GC 含量を増加させていき、千倍から一万倍の変異を誘発する。最後のグループには mutA、mutC が属し、これらは全てのタイプのトランスバージョンを 10 倍程度増加させるが、その機能については良く知られていない。

このように突然変異の原因となる前変異損傷の成因と誘発される突然変異は変異原によって異なっており、このことはランダム突然変異誘発にどのような変異原を用いるかによって、その効果が異なる可能性があることを示唆している。また、ランダム突然変異の効果を高めるためには、塩基の挿入や欠失によるフレームシフト突然変異や特定の塩基対のトランスバージョンの頻度を増加させるより、全ての塩基に対してランダムに点突然変異を導入することが有効である。

この出願の発明者らは、二重鎖 DNA の両方の DNA 鎖に均等に突然変異が入った場合（パリティ）と一方の DNA 鎖に突然変異が不均衡に蓄積された場合（ディスパリティ）の突然変異数とその分布に関するシュミレーションを行っている。その結果、ゲノムあたり一回の分裂で一カ所の突然変異が入る条件（パリティ）では、10 世代後の突然変異の分布は 12 回のシュミレーションの全てで突然変異数のモードが 10 個付近にあり、その分布は２個から２０個となること、また、世代を重ねると概ね世代数が突然変異数のモードとなり、同様の分布がシフトする傾向があることを示している。一方、全体の突然変異率は同じでも二重鎖 DNA の片方の鎖にもう片方

の100倍以上の確率で突然変異が入る条件（ディスパリティ）では、10世代後の突然変異数のモードは10個であるがその分布は0個から24個となることを見出している。このことは、総突然変異数が同じでも、DNA鎖の一方に多く突然変異が蓄積される場合は世代経過後の突然変異数の分布が異なることを示している（J. Theoretical Biology 157, 127-133, 1992）。

発明者らによるこれらの知見はランダム突然変異を導入する際に重要である。前変異損傷を起こさせる原因として放射線、紫外線などのエネルギー線や変異原物質を用いた場合には、二重鎖DNAの両方の鎖にランダムに前変異損傷が誘起されると考えられる。この場合の突然変異数の分布は上述のパリティの場合と同様である。一方、ミューテーター遺伝子の多くは前変異損傷を修復する機能に関係しているので、結果として固定される突然変異数の分布は次の様に理解される。mutTはA/T－G/Cの塩基特異的な修復機能に関係するので、突然変異はGC塩基対増加的である。これに対し、mutY、mutM、ungはmutTとは逆の塩基依存性であり、同様にAT塩基対増加的である。dnaE、dnaQは二重鎖DNAのラギング鎖での複製エラーの制御、校正機能に関与しているためにDNA鎖依存性である。mutL、mutS、mutHやuvrD、damはミスマッチ修復に関与しているが、塩基やDNA鎖に対して特異性はないので、前変異損傷の状態を反映すると考えられる。同様にmutAおよびmutCも塩基やDNA鎖に対する特異性はなく、全てのタイプのトランスバージョン修復に関与する。

ところで、実際の突然変異の効果は、致死的効果を持つもの、遺伝子機能に影響を与えないか殆ど与えない中立的なもの、機能に何らかの変更が加わるものに分けられる。一般に致死的効果を示さない突然変異が保存される可能性がある。また、突然変異のランダム性についてはミューテーター遺伝子の機能を考えると、mutT、mutY、mutM、ungは特定の塩基対を増加させる傾向がある。また、変異原の中にもチミジンダイマーを形成させるなど特定の前変異損傷を増加させるものがある。このようなタイプの突然変異誘発はランダム性に関して充分でないことが予想され、これらを突然変異誘発に用いると特定の変異が蓄積されることとなり、生物体の遺伝的改良効果に制限が生じる可能性がある。

一方、DNA合成の際には4種の塩基の互変異性に基づく誤った塩基対の形成は4

種の塩基に対してランダムに起こり、これに基づく前変異損傷が修復されなければ染色体 DNA にランダムな突然変異を導入することができると考えられる。これらを可能にするのは dnaE や dnaQ など DNA 校正機能に係るミューテーター遺伝子である。

さらに、この出願の発明者らは、温度感受性変異性のミューテーター遺伝子である dnaQ49 を持つ大腸菌に挿入したプラスミドにおいて、数回の複製後、ラギング鎖のほうがリーディング鎖よりも数倍から百倍、突然変異率が高いことを見いだしている（Mol. Gen. Genet., 251:657-664, 1996）。そしてさらに、この出願の発明者らは、実施例４に示したように、dnaQ49 株のゲノム DNA においても、リーディング鎖よりもラギング鎖に多くの変異が生じることを見出している。二重鎖 DNA に不均衡に突然変異が蓄積されることは均衡に蓄積される場合と異なり、突然変異の多様性が高まると推察される。

細胞または生物個体に絶滅の危険性を低下させつつ効率的、効果的に突然変異を導入するためには、処理群に存在する細胞や生物個体の遺伝的多様性を大きくすることが必要であり、そのためには４種の塩基にランダムに点突然変異を導入しつつ、二重鎖 DNA に不均衡に点突然変異を分布させることが重要である。

この出願の発明者らは、これらの知見に基づき、DNA 鎖の一方に他方より多くのランダムな点突然変異を多く蓄積させることにより、突然変異率を上げつつ変異処理細胞や生物個体の絶滅の危険性を低下させて効率的、効果的に突然変異体を得る方法を開発した。具体的には、例えば、遺伝的に改変または改良を行いたい細胞や生物個体に校正機能に係るミューテーター遺伝子を導入し、DNA 鎖の一方に他方より多くランダムな点突然変異を蓄積させる条件で突然変異誘発処理を行う。また、ミューテーター遺伝子に温度感受性などの条件発現的ミューテーター遺伝子を利用することも好ましい。このようなミューテーター遺伝子を用いた場合には、温度条件等の操作によって、突然変異の導入と変異体の固定を任意に設定することが可能となる。誘発させる突然変異率は好ましくは自然突然変異の 100 倍から 10 万倍の範囲で、一方の DNA 鎖が他方に対して数倍から 100 倍以上の突然変異を蓄積する条件が適当である。

なお、ミューテーター遺伝子を持つ細胞や生物個体は公知の方法（Journal of Bacteriology, 153, 1361-1367, 1983）によって得ることができる。また、遺伝子工学的にミューテーター遺伝子を導入することも可能である。

さらに、突然変異を導入する工程と変異体を選択する工程を別個に行い、突然変異を誘発する工程では選択圧をかけない条件で行い、処理個体群を一定の数まで増殖させた後、変異体を固定、選択する工程を行い、２回目以降、同様の操作を繰り返すことにより効率的、効果的に目的とする突然変異体を得ることができる。

以下、実施例を示し、この出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例によって限定されるものではない。

実施例１

温度感受性のミューテーター遺伝子（dnaQ）を持つ KH1366（dnaQ49）株および KH1370（dnaQ+）株（奈良先端科学技術大学院大学の真木寿治教授より入手）を培養し、各々のアンピシリン耐性の程度を測定した。

なお、dnaQ49 株は、DNA ポリメラーゼⅢのεサブユニットが変異しており、DNA ポリメラーゼⅢのプルーフリーディング機能に欠陥がある。このため DNA 複製エラーを校正できず、全ての塩基置換による変異が発生する。この変異は温度感受性であるために培養温度が 24℃から 37℃にシフトすることにより、突然変異率が 10^{-9} から 10^{-4} に増加する。一方、dnaQ+株は dnaQ49 株の復帰突然変異により DNA ポリメラーゼⅢのεサブユニットが正常になった株である。この dnaQ+株は dnaQ49 株の野生型として用いた（以下、dnaQ+株を野生型と記載することがある）。

まず、突然変異を誘発していない dnaQ49 株および野生型を種々の濃度のアンピシリンを含む寒天培地に播種し、24℃で２日間培養してコロニーを形成させ、dnaQ49 株および野生株のアンピシリン濃度－生残曲線を作成した。Ampicillin Sodium Salt（SIGMA, A-9518）は精製水に溶解して原液とし、培養液に望む希釈濃度になるよう加えた。また、濃度－生残曲線の作成には培養液の 550nm に於ける吸光度測定により行った。

結果は第１図に示したとおりであり、dnaQ49 株のほうが野生型よりもわずかにア

ンピシリン耐性が強いことが確認された。

次いで、dnaQ49 株および野生型を、各々、5 ml の L-broth 培地に 2,000 個/ml の密度で播種し、変異導入温度である 37℃で 24 時間培養した。なお、野生型には、公知の変異原物質である 1 -Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine（MNNG ; Aldrich 12, 994-1）を 0 ～60μg/ml 培地の濃度で培地に加えた。

24 時間培養後に増殖してきた菌を回収し、様々なアンピシリン濃度の培地で 24℃で 48 時間培養し、各大腸菌の生残率をコロニー形成法により決定した。

第２図は、37℃で 24 時間変異させた dnaQ49 株、野生型および MNNG 野生型のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度－生残曲線である。dnaQ49 株のアンピシリン耐性最大濃度は 30μg/ml であり、野生型および MNNG 野生型（3 ～ 6 μg/ml）に比べ有意に高いことが確認された。なお、60μl/mg 濃度の MNNG 存在下で培養した野生型は全く増殖しなかったことから、高濃度の MNNG は生存に必要な遺伝子にも変異を生じさせ、その結果として絶滅したものであると考えられる。

次いで、上記 24℃の培養において生育した最大濃度のアンピシリン含有培地のコロニーを用い、第２回目の突然変異導入を行った。すなわち、dnaQ49 株は 30μg/ml のアンピシリン含有培地で、MNNG 10μg/ml 処理群はアンピシリン６μg/ml 含有培地で、その他の MNNG 処理群は３μg/ml アンピシリン含有培地でそれぞれ 24℃で培養し、増殖した菌を洗浄後、2000 個/ml の密度に調整し、37℃で 24 時間培養した。次いで、菌を洗浄した後、種々のアンピシリン濃度の培地に播種し、24℃で２－３日間培養し、コロニーを形成させ、各大腸菌の生残率を測定した。なお、MNNG 処理群は実施例２と同様の濃度の MNNG を処理した。

第３図は、２回目の変異導入を行った dnaQ49 株、野生型および各 MNNG 処理群のアンピシリン感受性を示すアンピシリン濃度－生残曲線である。dnaQ49 株のアンピシリン耐性最大濃度は 300μg/ml であり、野生型および MNNG 野生型（6 ～30μg/ml）に比べ有意に高いことが確認された。なお、第３図に結果を示していない MNNG 処理群は絶滅したことを示している。

以下、同様の操作を繰り返し、５回目まで変異導入を行った。24℃での増殖におけるアンピシリン濃度（前のコロニー形成時におけるアンピシリン耐性最大濃度）

および 24℃でのコロニー形成日数は表１に示したとおりである。また、図４～６はそれぞれ第３～５回目の変異導入後のアンピシリン濃度－生残曲線である。

これらの結果から明らかなように、５回目までの変異誘発処理によって、約 6,000 μg/ml のアンピシリン存在下でも増殖する dnaQ49 株が得られた。また、同様の変異導入操作を別の dnaQ49 株で実施したところ、５回の変異誘発処理によって約 10,000 μg/ml までのアンピシリン耐性菌株が得られた（図７）。なお、このような操作の過程で絶滅した dnaQ49 株は無かった。この菌体内にはプラスミドは存在せず、この耐性能がゲノム遺伝子の変異によるものであることが示された。

表１

菌株（MNNG 濃度）	１回目		２回目		３回目		４回目		５回目
	amp 濃度	培養日数	amp 濃度	培養日数	amp 濃度	培養日数	amp 濃度	培養日数	amp 濃度
ｄｎａＱ４９	30	8	300	6	1000	5	3000	16	6000
野生型　(0)	3	8	10	6	10	5	10	16	60
野生型　(1)	3	8	10	6	10	5	10	16	60
野生型　(3)	3	8	30	6	100	5	300	16	絶滅
野生型　(6)	3	8	6	6	10	5	10	16	30
野生型 (10)	6	8	絶滅						
野生型 (30)	3	8	絶滅						
野生型 (60)	絶滅								

また、このアンピシリン耐性 dnaQ49 株に対する種々の抗生物質の最小増殖阻止濃度（MIC）を調べたところ、アンピシリンと同様のβ－ラクタム系抗生物質であるセフォタキシムに対しても強い耐性を示したが、アンピシリンとは作用機序の異なる抗生物質に対しては耐性能を獲得していなかった（表２）。なお、これまで報告されているアンピシリン耐性大腸菌の耐性濃度は 1,500 μg/ml であるが、この耐性能はプラスミドによるものである。また、アンピシリンを加えずに 37℃で変異誘発を行った場合には、10 回の操作でもアンピシリン耐性菌を得ることは出来なかった。

これらの結果、変異原を用いたコントロールおよびこれまで報告されている耐性菌に比べ、高濃度のアンピシリンに耐性を示す耐性菌を短期間に獲得することがで

きた。一方、MNNG 処理群では、高濃度処理では菌の絶滅が起こり、低濃度処理では 300μg/ml の耐性菌しか得られなかった。

表２

	dnaQ	Wild-type	スーパーアンプ耐性dnaQ
Ampicillin	2	1	2048
Cefotaxime	0.0313	0.0156	64
Chloramphenicol	1	0.5	0.5
Tetracyclin	0.25	0.25	0.25
Rifampicin	8	4	2
Streptomycin	1	1	0.5
Nalidixic acid	1	2	0.5
Ofloxacin	0.0156	0.0625	0.0156

	スーパーストレ耐性dnaQ
Streptomycin	2048

	スーパーナリ耐性dnaQ
Nalidixic acid	2048

	スーパーオフロ耐性dnaQ
Ofloxacin	1024

実施例２

実施例１と同様にして dnaQ49 株に変異を導入し、オフロキサシン、ナリジキ酸、ストレプトマイシンの各々に対する薬剤耐性菌を作製した。その結果、表３～５に示したとおり、500μg/ml までのオフロキサシン耐性菌、7,000μg/ml のナリジキ酸に対する耐性菌、26,000μg/ml のストレプトマイシンに対する耐性菌を得た。

表３

変異誘発処理	オフロキサシン濃度（μ g/ml）	培養日数
1回目	0.001	11
2回目	0.01	6
3回目	0.1	9
4回目	1	4
5回目	10	3
6回目	30	3
7回目	50	3
8回目	60	3
9回目	70	3
10回目	80	3
11回目	90	3
12回目	100	7
13回目	120	3
14回目	132	3
15回目	144	3
16回目	150	7
17回目	156	3
18回目	168	2
19回目	180	2
20回目	210	2
21回目	240	2
22回目	270	2
23回目	300	2
24回目	320	6
25回目	330	4
26回目	340	4
27回目	350	3
28回目	360	4
29回目	370	3
30回目	380	4
31回目	400	2
32回目	425	3
33回目	450	3
34回目	475	3
35回目	500	3

*1：変異誘発前の培養は、オフロキサシン濃度0.01 μ g/ml、２４℃、４８時間とした。

*2：変異誘発条件では、３７℃で培養した。

*3：ｄｎａＱ＋株（野生型）は0.1 μ g/ml のオフロキサシン存在下では増殖してこなかった。

表４

変異誘発処理	ナリジキ酸濃度（μ g/ml）	培養日数
1回目	1	1
2回目	10	1
3回目	100	28
4回目	200	2
5回目	400	3
6回目	600	2
7回目	1000	2
8回目	1100	1
9回目	1200	1
10回目	1300	1
11回目	1400	1
12回目	1600	1
13回目	1800	2
14回目	2000	1
15回目	2500	1
16回目	3000	1
17回目	4000	1
18回目	5000	9
19回目	6000	5
20回目	6200	11
21回目	6400	7
22回目	6600	5
23回目	6800	5
24回目	7000	

*1：変異誘発前の培養は、ナリジキ酸濃度１μ g/ml、２４℃、４８時間とした。

*2：変異誘発条件では、３７℃で培養した。

*3：ｄｎａＱ＋株（野生型）は10μ g/mlのナリジキ酸存在下では増殖してこなかった。

表５

変異誘発処理	ストレプトマイシン濃度（μg/ml）	培養日数
1回目	1	3
2回目	10	1
3回目	100	28
4回目	1000	2
5回目	3000	2
6回目	4000	2
7回目	6000	2
8回目	8000	2
9回目	9000	3
10回目	10000	4
11回目	12000	4
12回目	14000	8
13回目	16000	5
14回目	17000	11
15回目	18000	3
16回目	19000	6
17回目	20000	5
18回目	21000	5
19回目	22000	6
20回目	23000	4
21回目	24000	8
22回目	25000	10
23回目	26000	

*1： 変異誘発前の培養は、ストレプトマイシン濃度1μg/ml、２４℃、４８時間とした。
*2： 変異誘発条件では、３７℃で培養した。
*3： ｄｎａＱ＋株（野生型）は10μg/mlのストレプトマイシン存在下では増殖してこなかった。

また、オフロキサシン耐性菌において、菌の耐性獲得に関連する酵素の変異を解析したところ、耐性度の低い菌（１～30μg/ml）ではジャイレースＡの83位のセリンがロイシンに変異していた。また、耐性度100μg/mlの菌はジャイレースＡの83位のセリンがロイシンに変異しているのに加え、耐性増加に必要な他の酵素であるトポイソメラーゼⅣの80位のセリンがアルギニンに変異していた（表６）。この結果から、この発明の方法によって、複数の遺伝子に効率よく変異導入が可能である

ことが示された。また、導入された変異は臨床的に観察された耐性菌の変異と同じものであり、耐性能が上昇するにつれて固定される変異が増加する耐性獲得のメカニズムも同じものであった（J.Infect Chemother 3:128-138, 1997）。

以上の結果は、この発明の方法が、種々の生物機能の発現に関連する複数の遺伝子を一度に改変することが可能であること、そして、そのような遺伝子の多様な改変により、薬剤耐性菌など新たな変異体の出現予測やそのメカニズムの解明などに利用できることを示している。

表６

菌の耐性度（OFLX）	GyrA	ParC
0.1 μ g/ml	no	no
1.0 μ g/ml	83-Ser → Leu	no
3.0 μ g/ml	83-Ser → Leu	no
30.0 μ g/ml	83-Ser → Leu	no
100.0 μ g/ml	83-Ser → Leu	83-Ser → Arg

実施例３

実施例１と同様にして dnaQ49 株に変異を導入し、アルカリ耐性菌を作製した。その結果、表７に示したとおり、12 回の突然変異誘発により pH 9.8 までの耐性菌を得た。

表７

変異誘発処理	pH	培養日数
1回目	9.5	2
2回目	9.4	2
3回目	9.4	3
4回目	9.4	2
5回目	9.5	3
6回目	9.5	2
7回目	9.5	2
8回目	9.7	39
9回目	9.7	2
10回目	9.7	3
11回目	9.7	16
12回目	9.8	

*1：変異誘発前の培養は、pH9.5、２４℃、４８時間とした。
*2：変異誘発条件では、３７℃で培養した。
*3：ｄｎａＱ＋株（野生型）は pH9.5 では増殖してこなかった。

実施例４

大腸菌 E. coli の ampC 遺伝子（GenBank Accession No. J01611, J01583）の 4249－4251 位のコドン"att"は、"ttt"に変異しやすいことが知られている。そこで、この部位の変異がリーディング鎖の変異に起因するか、それともラギング鎖の変異に起因するかを検討した。

１．方法

E. coli の ampC 遺伝子はラギング鎖として合成されることが知られているので、4260－4212 位の－鎖プラス付加配列（配列番号１）をラギング鎖の fidelity 測定用のプローブとした。また、4235－4281 位の＋鎖プラス付加配列（配列番号２）をリーディング鎖の fidelity 測定用プローブとした。

さらに、配列番号３のオリゴヌクレオチドをラギング鎖およびリーディング鎖のfidelity測定用のリンカーDNAとした。

先ず、dnaQ49を１世代時間（菌浮遊液のOD_{550}が２倍になるのに要する時間）、37℃で培養した後、ゲノムDNAを精製し、制限酵素Fnu4H IおよびMsp Iで処理してampC遺伝子を含む二本鎖DNA断片（4212－4279位）を得た。

得られたDNA断片、ラギング鎖のfidelity測定用プローブおよびリンカーDNAをハイブリダイズさせた。同様に、DNA断片、リーディング鎖のfidelity測定用プローブおよびリンカーDNAをハイブリダイズさせた。

各々のプローブとハイブリダイズしたDNA断片とリンカーDNAとをT4 DNA Ligaseを用いてライゲーションさせ、DNAを精製した後、"aatt"を認識する制限酵素TSPE Iで処理した。

次いで、ラギング鎖のfidelity測定用プローブとハイブリダイズしたDNA断片を、配列番号４の塩基配列（4279－4259位の－鎖）を有するオリゴヌクレオチドとリンカーDNA（配列番号２）をそれぞれプライマーとしてPCR増幅した。また、リーディング鎖のfidelity測定用プローブとハイブリダイズしたDNA断片を、配列番号５の塩基配列（4212－4232位の＋鎖）を有するオリゴヌクレオチドとリンカーDNAをプライマーとしてPCR増幅した。

なお、コントロールとして、野生型$dnaQ^+$株のampC遺伝子についても、同様の手続によりラギング鎖およびリーディング鎖の変異を検討した。

２．　結果

PCR増幅の結果は第８図に示したとおりである。この第８図は、各々のPCR産物をアガロース電気泳動で解析した結果であり、レーン１はマーカー、レーン２および３は、$dnaQ^+$株ampC遺伝子由来のDNA断片のPCR産物を電気泳動した結果である。このレーン２および３のバンドから明らかなように、ラギング鎖測定用プローブとハイブリダイズしたDNA断片（レーン２）、およびリーディング鎖測定用プローブとハイブリダイズしたDNA断片（レーン３）においては100bpあたりのバンドは観察されなかった。このことは、$dnaQ^+$株のampC遺伝子には、ラギング鎖、リーディング鎖ともに変異が生じていないことを意味する。すなわち、いずれのDNA

断片もコドン"att"が変異していないために、PCR前の制限酵素TSPE I処理によって切断され、その結果、PCR増幅されなかった。

一方、レーン４および５は、dnaQ49株ampC遺伝子由来のDNA断片のPCR産物を電気泳動した結果である。このレーン４および５に示した結果から明らかなように、リーディング鎖測定用プローブとハイブリダイズしたDNA断片（レーン５）には100bpのPCR産物の存在を示すバンドは観察されないが（すなわち、リーディング鎖には変異が生じていない）、ラギング鎖測定用プローブとハイブリダイズしたDNA断片（レーン４）の場合には、100bpのPCR産物の存在を示すバンドが観察された。

以上の結果から、大腸菌dnaQ49株の場合には、ゲノムDNAのレベルにおいてもリーディング鎖よりもラギング鎖のほうがより多くの変異を蓄積することが確認された。

産業上の利用可能性

この出願の発明によって、微生物や細胞、または生物個体の多様かつ有用な変異体を効率的、効果的に作製することができる。また、遺伝子の変異の状況を解析することにより、薬剤耐性のメカニズムの解明、新規な耐性菌の発生予測やその対応薬剤の開発への利用やガン遺伝子の変異と転移や悪性度の増加のメカニズムの解析とその治療法の開発等が可能となる。

請求の範囲

１．　細胞または生物個体の二重鎖ゲノム DNA の一方の鎖に他方よりも多く点突然変異を導入することを特徴とする遺伝子への突然変異導入方法。

２．　４種の塩基に対しランダムに点突然変異を導入する請求項１の遺伝子突然変異導入方法。

３．　細胞または生物個体が、突然変異修復機構遺伝子群にミューテーター遺伝子を有する変異細胞株または変異生物個体である請求項１または２の突然変異導入方法。

４．　ミューテーター遺伝子が、dnaQ、dnaE、mutL、mutS、mutH、uvrD、dam からなる群より選択される１種または２種以上の変異遺伝子である請求項３の突然変異導入方法。

５．　ミューテーター遺伝子が、所定の条件下で突然変異修復機構の欠損を生じさせる遺伝子である請求項３または４の突然変異導入方法。

６．　突然変異修復機構の欠損条件が所定の温度である請求項５の突然変異導入方法。

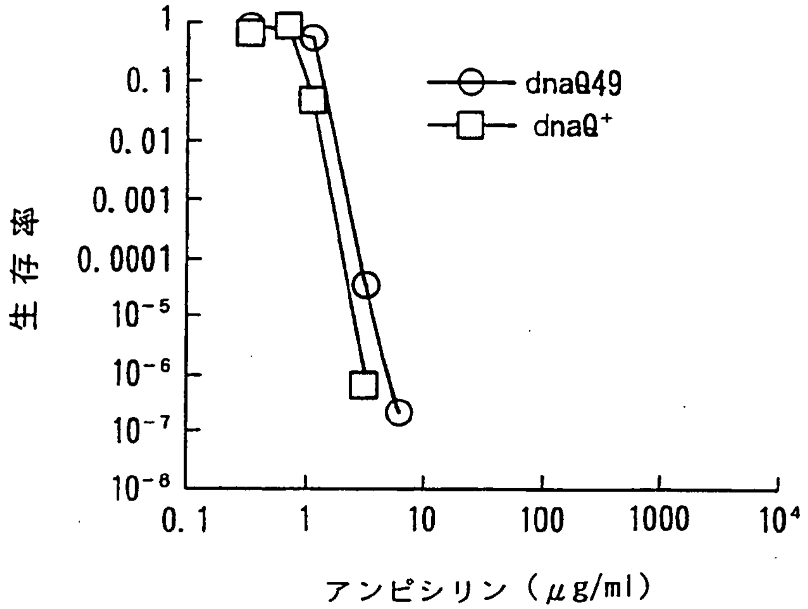
７．　所定の条件下でゲノム DNA へ突然変異を導入する工程と、突然変異を導入しない選択圧条件で変異体を選択する工程を繰り返すことを特徴とする請求項５または６の突然変異導入方法。

８．　第２回目以降の突然変異導入工程を、直前の変異体選択工程と同一の選択圧下で行う請求項７の突然変異導入方法。

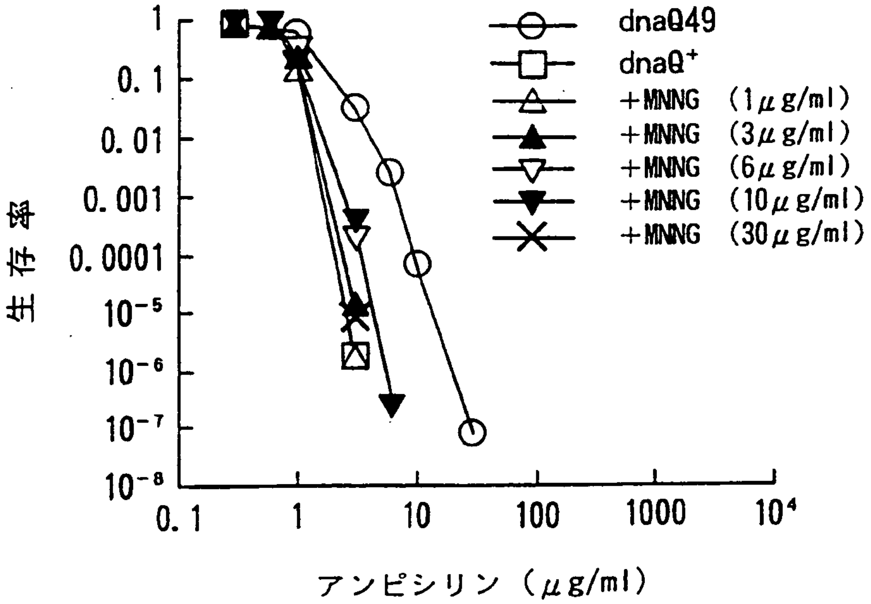
9．　請求項１ないし８のいずれかの方法によってゲノム DNA に突然変異が導入された細胞または生物個体の突然変異体。

10.　請求項９の突然変異体より単離された変異遺伝子。

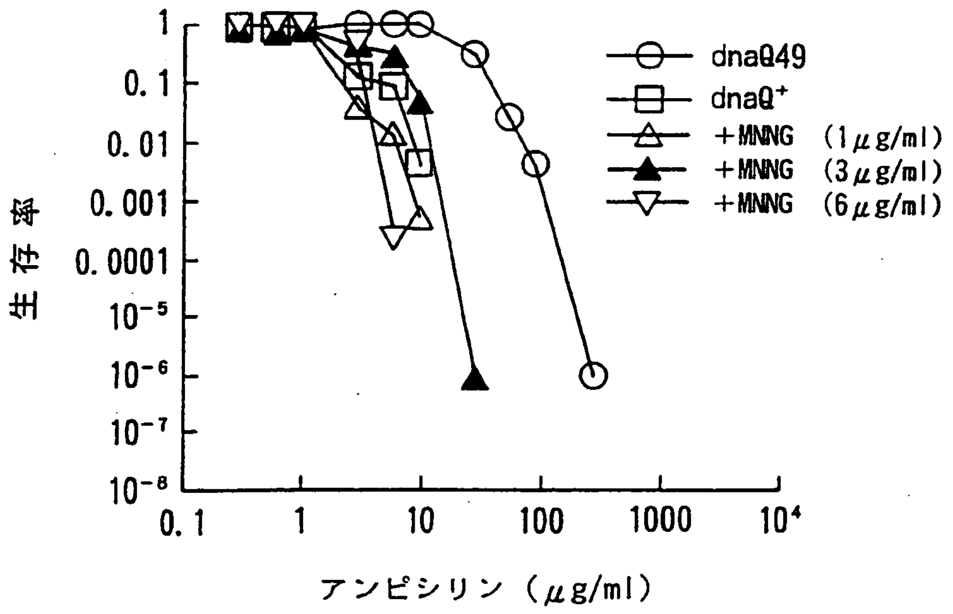
第１図


生存率
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
10^{-5}
10^{-6}
10^{-7}
10^{-8}
0.1
1
10
100
1000
10^{4}
アンピシリン（μg/ml）
dnaQ49
dnaQ⁺

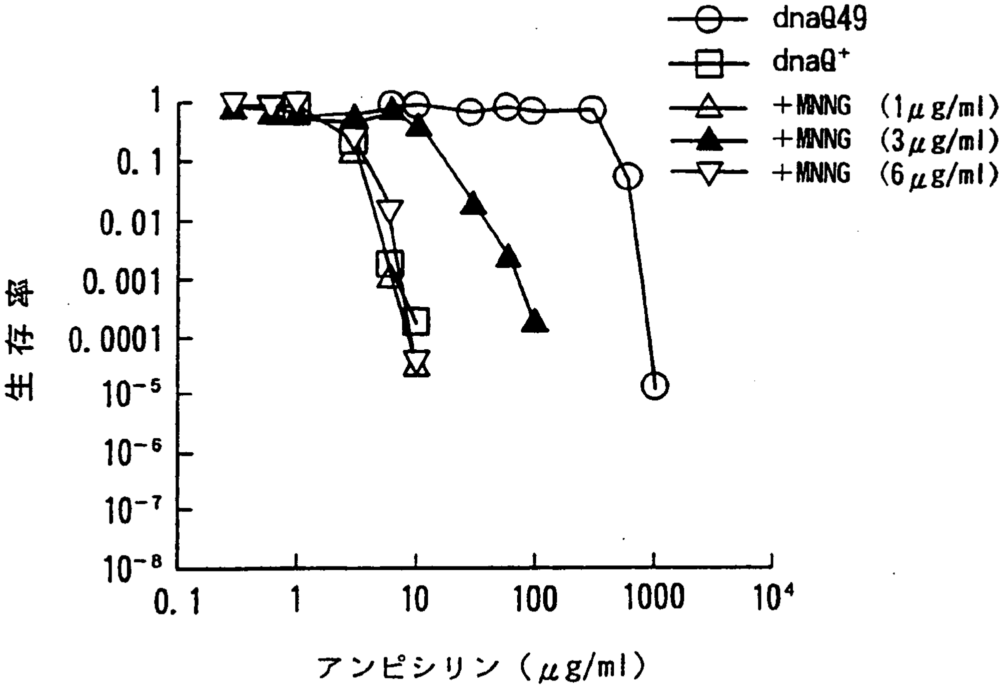
第２図


1
0. 1
0. 01
0. 001
0. 0001
10⁻⁵
10⁻⁶
10⁻⁷
10⁻⁸
生存率
0. 1
1
10
100
1000
10⁴
アンピシリン（μg/ml）
dnaQ49
dnaQ⁺
+MNNG （1μg/ml）
+MNNG （3μg/ml）
+MNNG （6μg/ml）
+MNNG （10μg/ml）
+MNNG （30μg/ml）

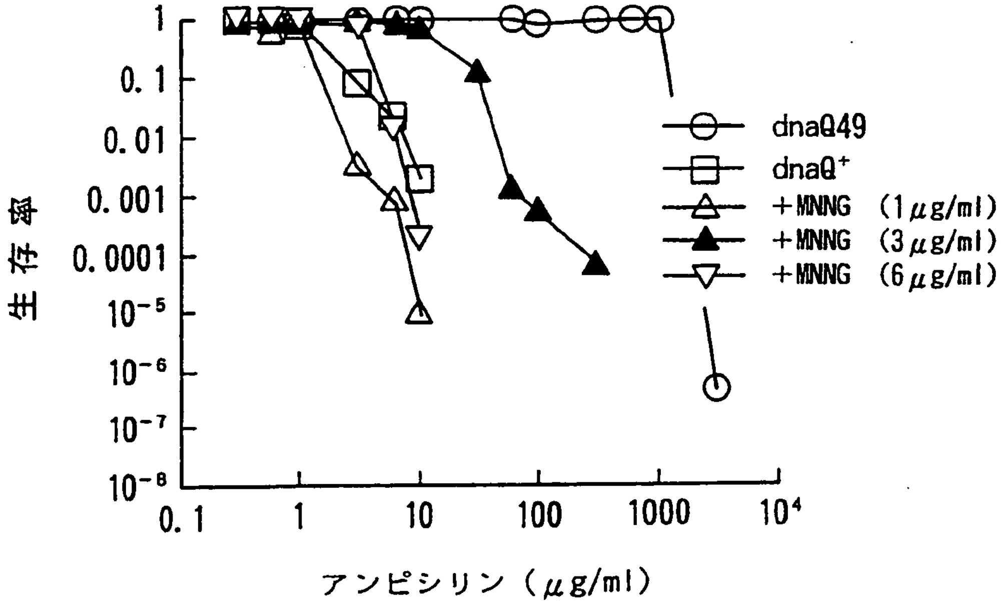
第３図


生存率
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
10^{-5}
10^{-6}
10^{-7}
10^{-8}
0.1
1
10
100
1000
10^{4}
アンピシリン（μg/ml）
dnaQ49
dnaQ+
+MNNG (1μg/ml)
+MNNG (3μg/ml)
+MNNG (6μg/ml)

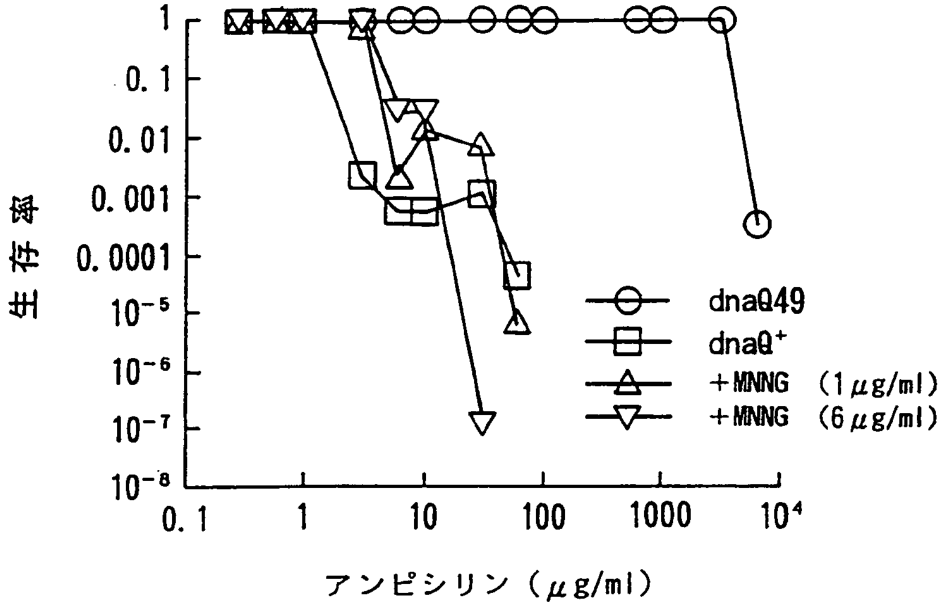
第４図


dnaQ49
dnaQ⁺
+MNNG (1μg/ml)
+MNNG (3μg/ml)
+MNNG (6μg/ml)
生存率
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
10⁻⁵
10⁻⁶
10⁻⁷
10⁻⁸
0.1
1
10
100
1000
10⁴
アンピシリン（μg/ml）

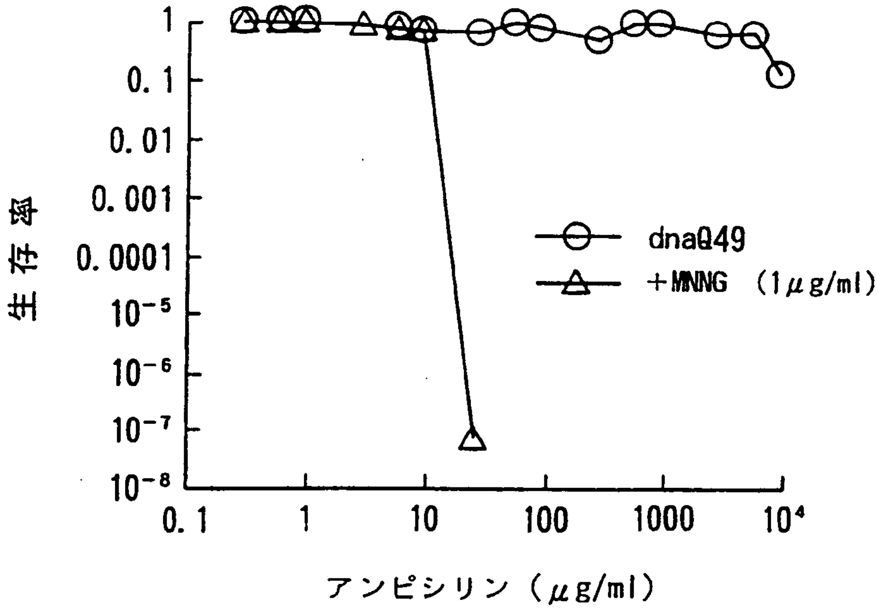
第５図


生存率
1
0. 1
0. 01
0. 001
0. 0001
10⁻⁵
10⁻⁶
10⁻⁷
10⁻⁸
0. 1
1
10
100
1000
10⁴
アンピシリン（μg/ml）
dnaQ49
dnaQ⁺
+MNNG (1μg/ml)
+MNNG (3μg/ml)
+MNNG (6μg/ml)

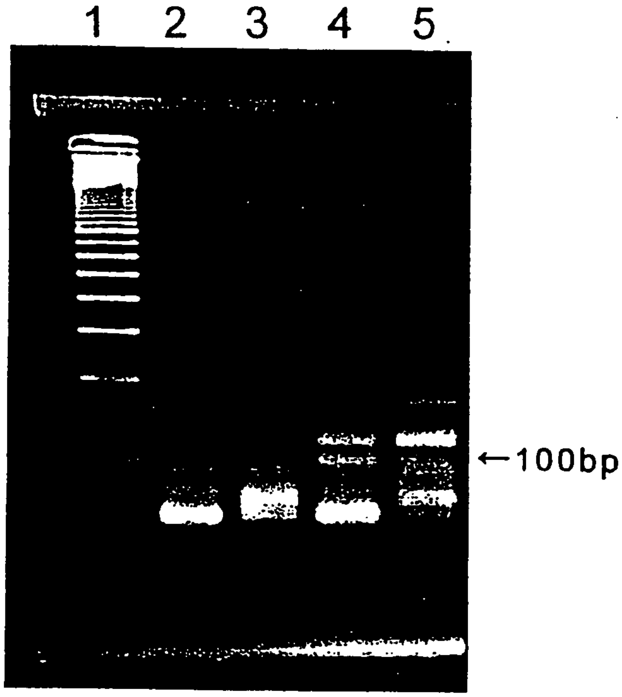
第６図


生存率
1
0. 1
0. 01
0. 001
0. 0001
10⁻⁵
10⁻⁶
10⁻⁷
10⁻⁸
0. 1
1
10
100
1000
10⁴
アンピシリン（μg/ml）
dnaQ49
dnaQ⁺
＋MNNG （1μg/ml）
＋MNNG （6μg/ml）

第７図


生存率
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
10⁻⁵
10⁻⁶
10⁻⁷
10⁻⁸
0.1
1
10
100
1000
10⁴
アンピシリン（μg/ml）
dnaQ49
+MNNG （1μg/ml）

第８図



配列表

Sequence Listing

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> 突然変異誘発方法

<130> 99-F-056PCT

<140>

<141>

<150> JP No. 10-321143

<151> 1998-11-11

<160> 5

<210> 1

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 1

aagcggggta attgtgcgat gcacaatatcgttgatttgt tgaggggcac ccccccccc 59

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 2

ttgtgcatcg cacaattacc ccgcttatag agcaacaaaa gatcccgccc ccccccc 57

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 3

gattaggatc cactaatatc gggggggggg 30

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 4

ggatcttttg ttgctctata a 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthesized oligonucleotide

<400> 5

tgcccctcaa caaatcaacg a 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/06294

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl^7 C12N15/01, C12N15/11, C12N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl^7 C12N15/01, C12N15/11, C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI,WPI/L,BIOSIS PREVIEW,CAS ONLINE,GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Iwaki T.et al."Preferential replication-dependent mutagenesis in the lagging DNA strand in Escherichia coli" Mol.Gen.Genet. Vol. 251 (1996) p.657-664	1-10
A	Trinh TQ.et al."Preferential DNA secondary structure mutagenesis in the lagging strand of replication in E.coli" Nature, Vol.352 (1991) p.544-547	1-10
A	Rosche WA.et al."Differential DNA secondary structure-mediated deletion mutation in the leading and lagging strands" J.Bacteriol., Vol.177 (1995) p.4385-4391	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 01 February, 2000 (01.02.00)	Date of mailing of the international search report 29 February, 2000 (29.02.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告	国際出願番号　PCT／JP99／06294

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl^7 C12N15/01, C12N15/11, C12N1/21

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl^7 C12N15/01, C12N15/11, C12N1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEW, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C.　関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Iwaki T. et al. "Preferential replication-dependent mutagenesis in the lagging DNA strand in Escherichia coli" Mol. Gen. Genet. 第251巻（1996）p. 657-664	1-10
A	Trinh TQ. et al. "Preferential DNA secondary structure mutagenesis in the lagging strand of replication in E. coli" Nature, 第352巻（1991）p. 544-547	1-10
A	Rosche WA. et al. "Differential DNA secondary structure-mediated deletion mutation in the leading and lagging strands" J. Bacteriol., 第177巻（1995）p. 4385-4391	1-10

□ C欄の続きにも文献が列挙されている。　　□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 01.02.00	国際調査報告の発送日 29.02.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　4B　9050 加藤　浩 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☑ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☑ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: ______________________________

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.